

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-73380

(43) 公開日 平成8年(1996)3月19日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 48/00				
9/127	M			
31/70	ADU			
C 0 7 H 21/04	B			
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
		審査請求 未請求 請求項の数13	FD (全 14 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-232498

(22) 出願日 平成6年(1994)9月2日

(71) 出願人 000205627

大阪府

大阪府大阪市中央区大手前2丁目1番22号

(71) 出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都中央区新川二丁目10番1号

(72) 発明者 高橋 克仁

大阪府池田市鉢塚3丁目9-25-506

(72) 発明者 柴田 宣彦

大阪府堺市堀上緑町2丁目8-31

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 抗癌剤

(57) 【要約】

【構成】 カルボニン遺伝子を有効成分として含む抗癌剤。

【効果】 本発明の抗癌剤により、癌細胞の造腫瘍性を低下させ、転移能を減弱させることができる。従って、本発明の抗癌剤は、癌の治療および予防、特に癌転移の抑制に極めて有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カルボニン遺伝子を有効成分として含む抗癌剤。

【請求項2】 癌の治療に用いる、請求項1記載の抗癌剤。

【請求項3】 癌転移の抑制に用いる、請求項1記載の抗癌剤。

【請求項4】 カルボニン遺伝子が配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものである、請求項1記載の抗癌剤。

【請求項5】 配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列が配列番号1の塩基配列である、請求項4記載の抗癌剤。

【請求項6】 カルボニン遺伝子が合成または天然由来の膜の中に封入されたものである、請求項1～5のいずれかに記載の抗癌剤。

【請求項7】 カルボニン遺伝子がリポソームの中に封

入されたものである、請求項6記載の抗癌剤。

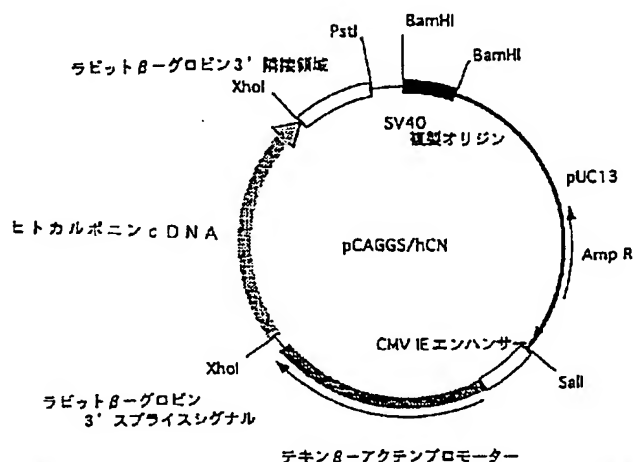
【請求項8】 カルボニン遺伝子が、腫瘍細胞内および/または正常細胞内で該遺伝子を発現することができる組換えベクターに含まれたものである、請求項1～5のいずれかに記載の抗癌剤。

【請求項9】 組換えベクターがプロモーターを含むものである、請求項8記載の抗癌剤。

【請求項10】 プロモーターがアクチンプロモーターである請求項9記載の抗癌剤。

【請求項11】 組換えベクターが約6.5kbの大きさを有し、サイトメガロウィルスのエンハンサー、チキンβ-アクチンプロモーター、ラビットβ-グロビン3' 隣接領域、SV40複製オリジン、およびヒトカルボニン遺伝子を含み、下記の制限酵素地図で表される組換えベクターpCAGGS/hCNである、請求項10記載の抗癌剤。

【化1】



【請求項12】 カルボニン遺伝子を含み組換えベクターが合成または天然由来の膜の中に封入されたものである、請求項8～11のいずれかに記載の抗癌剤。

【請求項13】 ヒトカルボニン遺伝子を含み組換えベクターがリポソームの中に封入されたものである、請求項12記載の抗癌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は抗癌剤に関し、さらに詳細には、カルボニン遺伝子を利用した抗癌剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 癌の治療には外科的療法、放射線療法、化学療法など、さらにはこれらを組み合わせた集学的療法が行われ、生存率の大幅な向上が認められるにいたった。しかしながら、癌患者の生存率の更なる向上のために臨床上問題となるのは原発巣より遊離した癌細胞が、他の臓器に転移し、予後不良となることである。このようなきわめて致命的な癌転移について、現状では満足な治療法はなく、従って、癌転移の制圧が望まれてお

り、癌転移に対し有効な薬剤の開発が急務となっている。癌転移の機構に関しては過去に多くの研究がなされ、特に血行性転移に関してはその詳細な機構が判明してきている。癌細胞は原発巣より遊離し、血管内に浸潤し、血流に乗り遠隔の転移先臓器まで運ばれる。ここで血管内皮細胞と接着し、細胞外基底膜構成成分を破壊しながら、血管外へ浸潤し、血管新生を伴いながら他臓器で増殖をするようになり転移が成立する (Liotta L. A. et al Cell 1991 ; 64 : 327-336)。癌転移抑制剤の開発にはこれら各ステップのいずれかを阻止すれば良いと理論的に考えることができる。事実、接着を抑制する物質 (Humphries M. J. Olden K. and Yamada K. Science 1986 ; 233 : 4647-470、あるいは、Iwamoto Y. et al Science 1987 ; 1132-1134)、血管新生阻害剤 (Yamaoka M. et al Cancer Research 1993 ; 53 : 4262-4267)、癌細胞の浸潤を抑制する物質 (公開特許公報 特開平3-31214)、基底膜分解酵素の阻害物質 (例えば、Irimura T. Nakajima M. and Nicolson G. L. Biochemistry 1989 ; 25 : 5322-5328、あるいは、公開特許公報

特開平5-194414)などが既に知られている。しかしながら、これらの物質は基礎実験の段階であり、実用化には至っていない。

【0003】一方、遺伝子導入技術の進歩と共に、遺伝子治療という新しい治療分野が確立されようとしている。癌に対する遺伝子治療には大きくわけて4通りある。第一は免疫療法の応用(例えば、Nabel G.J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993 ; 90 : 11307-11311、あるいはMulligan R.C. Science 1993 ; 260 : 926)、第二は自殺遺伝子を用いる方法で脳腫瘍の治療で行われている(例えば、Culver K.W. et al. Science 1992 ; 156 : 1550-1552)。第三は癌抑制遺伝子、癌原遺伝子をターゲットとする方法、第四は化学療法時の骨髄抑制を防御するために造血幹細胞に多剤耐性遺伝子を導入する方法である。しかしながら、これらの遺伝子治療法は原発腫瘍に対する効果は期待できるものの、抗転移効果という面からの検討はなされておらず、癌転移に対し有望と思われる遺伝子治療法は現状では未だ報告されていない。

【0004】【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、癌転移の抑制に有効な抗癌剤を提供することを目的とする。また、本発明は、原発巣に対しても有効な抗癌効果を示す抗癌剤を提供することを目的とする。

【0005】【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意努力を重ねた結果、カルボニン遺伝子を直接腫瘍細胞に導入することにより、造腫瘍性が低下し、転移能が減弱することを見出し、さらにはカルボニン遺伝子を予め個体内に投与することにより、動物モデルを用いた実験的転移評価系において転移結節数が著しく減少することを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、カルボニン遺伝子を有効成分として含む抗癌剤を提供するものである。

【0006】特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明の抗癌剤は直接腫瘍細胞にカルボニン遺伝子を導入し、発現させることにより、ラミニン受容体の減少に伴う腫瘍細胞の接着能に変化をもたらし、結果的に造腫瘍性を低下させ、転移能を減弱させるものと考えられる。また、直接、個体内にカルボニン遺伝子を導入した場合には血管壁内の平滑筋細胞を含む正常細胞でカルボニン遺伝子が発現することにより、血管壁など正常細胞の運動能、接着能を抑制し、その結果、癌細胞が血管壁外に浸潤するのを抑制するものと考えられる。

【0007】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において使用されるカルボニン遺伝子とは、カルボニンまたはカルボニン様タンパクをコードする遺伝子というものとする。カルボニンは、主に哺乳類平滑筋細胞に存在するトロポニン様のタンパク質として発見され(Takahashi, K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986 ;

141 : 20-26)、アクチンフィラメントに結合しミオシンATPaseの活性を阻害することが知られており(Winder, S.J. et al. J. Biol. Chem. 1990 ; 265 : 10148 - 10155)、平滑筋の収縮制御において重要な役割を担っていると考えられている。チキンのカルボニンのアミノ酸配列は高橋らによって決定されている(Takahashi, K. and Nadal-Ginnard, B. J. Biol. Chem. 1991 ; 266 : 13284 - 13288)。また、カルボニン様タンパクとしては、SM22、mp20が知られており、これらのカルボニン様タンパクのアミノ酸配列は、それぞれ、Thweatt、Ayme-Southgateらによって決定されている(Thweatt, R. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992 ; 187 : 1 - 7)(Ayme-Southgate, A. et al. J. Cell Biol. 1989 ; 108 : 521 - 531)。本発明においては、上記のカルボニンまたはカルボニン様タンパクをコードする遺伝子を利用することができる。

【0008】また、カルボニンcDNAは、最初にニワトリ砂囊よりクローニングされ(Takahashi, K. and Nadal-Ginnard, B. J. Biol. Chem. 1991 ; 266 : 13284 - 13288)、その後ヒト、ラットのカルボニンcDNAについてもクローニングの報告がなされている(Takahashi, K. et al. Japanese Circulation Journal 1992 ; 56 supplement : 40)(Shanahan, C. M. et al. Circulation Res. 1993 ; 73 : 193 - 204)。本発明においては、上記のカルボニンcDNAを使用してもよい。導入する遺伝子および発現されるタンパク質の免疫的拒絶反応を最小に抑えるために、また、治療の効果を上げるために、導入する遺伝子はヒト由来のものが望ましい。好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むカルボニン遺伝子、より好ましくは、配列番号1の塩基配列を含むカルボニン遺伝子を使用する。カルボニン遺伝子は補助的なコード配列を含んでいてもよく、また、それがコードするアミノ酸配列が付加、置換、欠如されたものであっても、カルボニンと同様の機能を有するものを発現するものであればよい。本発明において使用されるカルボニン遺伝子は、公知の技術を用いて、細胞から単離精製して得られたゲノムDNAもしくはcDNAであっても、また、これらがNarang等の方法(Narang, S. A. DNA synthesis Tetrahedron 1993 ; 39 : 3)に従って化学的に合成されたものであってもよい。

【0009】本発明においては、カルボニン遺伝子そのもののみを導入することにより目的を達成しうが、また、カルボニン遺伝子を含み、腫瘍細胞内、平滑筋細胞等の正常細胞内で該遺伝子を発現することができる組換えベクターを使用しても良い。本発明において使用できる組換えベクターは、カルボニン遺伝子と、該遺伝子の発現のための発現ベクターから構成される。一般的には、哺乳類細胞でタンパク質を発現させることのできるプラスミドベクターやDNAあるいはRNAのウィルスベクターを用いて、上記の発現ベクターを構築することができ

る。発現ベクターは、発現ベクターの複製を可能とする複製オリジン、発現のためのプロモーター、スプライスシグナル、ポリA付加シグナル、薬剤選択マーカー、エンハンサー等を必要に応じて選択し、組み合わせて構築することができるが、少なくともプロモーターを含むことが好ましい。発現ベクターの複製を可能とする複製オリジンには、SV40ウィルス、パピローマウィルス、EBウィルス (Epstein-barr virus) 等をあげることができ、また発現のためのプロモーターとしては $\beta$ -アクトチンプロモーター、エロンゲーションファクター1 $\alpha$ 、チミジンキナーゼプロモーター、SV40プロモーター、アデノウィルス主要後期プロモーター、サイトメガロウィルスプロモーター等をあげることができる。さらに、スプライスシグナル、ポリA付加シグナル、クローン選択を効率化するためにアンピシリン耐性遺伝子等の薬剤選択マーカー、細胞特異的に働くエンハンサーの他、導入遺伝子の発現を制御する転写制御遺伝子等を付加してもよい。本発明において使用可能な組換えベクターを構築するうえで好ましい発現ベクターとしてはpEF-BOS (Mizushima, S. et al. Nucleic Acid Research 1990 : 18 : 5322)、pcDL-SR  $\alpha$ 296 (Takebe, Y. et al. Molecular and Cellular Biology 1988 ; 8 : 466 -472)、pCAGGS (Niwa, H. et al. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 1991 ; 108 : 193 - 200)、pAd265SVp(A)3 (Kaufman, R. J. et al. Mol. Cell. Bio. 1985 ; 5 : 1750 - 1759)等のプラスミドあるいはウィルス等を挙げることができ、このうち、pCAGGSが特に好ましい。pCAGGSは、サイトメガロウィルスのエンハンサー、チキン $\beta$ -アクトチンプロモーター、ラビット $\beta$ -グロビン 3' スプライスシグナル、ラビット $\beta$ -グロビン 3' 隣接領域、SV40複製オリジンを有し、哺乳動物細胞中で組込んだ遺伝子を高い効率で発現させることができる。

【0010】本発明において使用可能な組換えベクターは当該技術の熟練者によく知られる技術 (Maniatis, T. et al. Molecular cloning : A laboratory manual 1989 ; Cold Spring Harbor Laboratory) を用いて、上記のような発現ベクターにカルボニン遺伝子を組込むことによって構築することができる。

【0011】カルボニン遺伝子、または、カルボニン遺伝子を含みかつ腫瘍細胞内および/または正常細胞内で該遺伝子を発現することができる組換えベクター (以下、「カルボニン遺伝子を含む組換えベクター」と記す。) を医薬的に許容できる賦形剤とともに医薬組成物として、溶液、懸濁液、ゲル等の形態に製剤化して、投与することができる。

【0012】また、カルボニン遺伝子、または、カルボニン遺伝子を含む組換えベクターを膜の中に封入した粒子を医薬的に許容できる賦形剤とともに医薬組成物として、溶液、懸濁液、ゲル等の形態に製剤化して、投与し

てもよい。カルボニン遺伝子、または、カルボニン遺伝子を含む組換えベクターを膜の中に封入することにより、該遺伝子または該組換えベクターをヌクレアーゼによる消化から防ぐことができ、またカルボニン遺伝子を導入する細胞を傷害することなく細胞内に高効率で導入することができる。リボソーム (Wong, T. K. et al. Science 1980 ; 215 : 166) や脂質エマルジョン等の合成膜の他、植物細胞から取ったプロトプラスト (Schaffner, W. Proc. Natl. Acad. Sci. 1980 ; 77 : 2163)、レトロウィルスのようなウィルスキヤプシド (Cone, R. D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1984 ; 81 : 6349)、赤血球膜ゴースト (Furusawa, M. et al. Nature 1974 ; 249 : 449) 等の天然由来の膜を利用することができるが、このうち、リボソームが好ましい。というのは、カルボニン遺伝子またはカルボニン遺伝子を含む組換えベクターに特別な処理を施すことなくそのまま用いてリボソーム中に封入することができ、また、ヒトに存在する脂質またはヒトの体内で代謝される脂質をリボソーム形成原料として用いれば、カルボニン遺伝子導入後にリボソームは代謝されて無害となる利点を有するからである。リボソームを形成する原料としては、N-[1-(2,3-ジオレオイロキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルサルフェート (DOTAP)、N-[1-(2,3-ジオレオイロキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロライド (DOTMA)、ジラウロイルフォスファチジルコリン (DLPC)、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン (DOPE)、ジラウロイルフォスファチジルエタノールアミン (DLPE)、ジミリスチルフォスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジオレオイルフォスファチジルコリン (DOPC)、ジミリスチルフォスファチジルコリン (DMPG)、N-( $\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタメートクロライド (TMAG) 等の脂質、およびこれらの混合物をあげることができる。これらの脂質は、カルボニン遺伝子DNAやカルボニン遺伝子を含む組換えベクターDNAに障害を与えることなく、これらDNAを効率よく取り込める十分な内容積を持つ大きな一枚膜リボソーム (LUV) を形成するので好ましい。例えば、N-[1-(2,3-ジオレオイロキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルサルフェート (DOTAP) とジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン (DOPE) の1:1(w/w)の混合物 (Felgner, D. L. et al. Lipofection : A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure Proc. Natl. Acad. Sci. 1987 ; 84 : 7413) やN-( $\alpha$ -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D-グルタメートクロライド (TMAG) とジラウロイルフォスファチジルコリン (DLPC) とジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン (DOPE) の1:2:2 (mol/mol/mol)の混合物 (Koshizaka, T. et al. J. Clin. Biochem. Nutr. 1989 ; 7 : 185) 等は、DNAを取り込むリボソームを形成することが知られている。上記脂質のうち、細胞

毒性が低いことから、N-[1-(2,3-ジオレオイロキシ)-プロピル]-N,N,N'-トリメチルアンモニウムメチルサルフェート(DOTAP)が特に好ましい。さらに、リポソームの表面にHVJ(Hemagglutinating virus of Japan)の糖タンパクを組み込み、あるいは共有結合させてたり、ポリエチレングリコール等を添加すると、細胞への遺伝子導入の効率が上がる。また、腫瘍細胞や平滑筋細胞へのターゲティングの特異性を上げるために、腫瘍細胞や平滑筋細胞表面に特異的な抗体や受容体リガンドをリポソームに組み込み、あるいは共有結合させてもよい。

【0013】カルボニン遺伝子やカルボニン遺伝子を含む組換えベクターは、当業界の熟練者によく知られている技術を用いて、上記のような膜の中に封入することができる。例えば、Danos, O. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1988 ; 85 : 6460、またはVenkatesh, L. K. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990 ; 87 : 8746に記載の方法に準じてカルボニン遺伝子またはカルボニン遺伝子を含む組換えベクターをウィルスキヤプシド中に封入することができる。また、カルボニン遺伝子やカルボニン遺伝子を含む組換えベクターを合成膜の中に封入するためには、カルボニン遺伝子またはカルボニン遺伝子を含む組換えベクターを、上記のような脂質、および、Hepes緩衝生理食塩水(150mM NaCl/20mM Hepes, pH7.4)、トリス塩酸緩衝液等と混合し、攪拌すればよい。さらに、カルボニン遺伝子またはカルボニン遺伝子を含む組換えベクターを合成膜の中に封入する際に、ポリエチレングリコール、植物レクチン等を添加してもよい。本発明の抗癌剤において、カルボニン遺伝子と膜の比率、および、カルボニン遺伝子を含む組換えベクターと膜の比率は、カルボニン遺伝子の所望の発現量が得られるように選択されるが、膜の中にカルボニン遺伝子またはカルボニン遺伝子を含む組換えベクターが10~50重量%の割合で含まれることが好ましい。

【0014】本発明の抗癌剤の投与形態としては、通常の静脈内、動脈内投与等の全身投与の他に、癌原発巣に対して、または、癌種に対応した予想転移部位に対して、局部注射、局部塗布、経口投与、経皮投与等の局所投与を行うことができる。さらに、本発明の抗癌剤の投与にあたっては、カテーテル技術、遺伝子導入技術または、外科的手術等と組み合わせた投与形態をとることができる。

【0015】有効成分である、任意に膜内に封入されたカルボニン遺伝子またはカルボニン遺伝子を含む組換えベクターを医薬的に許容できる賦形剤とともに医薬組成物として、従来の製剤上の慣用技術に従って、製剤化することができる。医薬的に許容できる賦形剤としては、希釈剤、充填剤、滅菌した水性媒体および種々の無毒性有機溶媒を挙げることができる。また、この医薬組成物に、製剤上許容しうるもの、例えば、安定剤、緩衝剤、等張剤を適宜組み合わせ、あるいは選択して添加するこ

とができる。ここで、安定剤の例として、グルコース、マンニトール等の糖類、グリシンなどのアミノ酸類、HS A、BSA、あるいはゼラチン等が、緩衝剤の例として、トリス緩衝剤、PBS緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、あるいはHEPES緩衝剤等が、等張剤の例として、塩化ナトリウムなどの塩類、グルコース、マンニトール等の糖類があり、これらの水溶液に有効成分を溶解、もしくは懸濁した製剤を用いることができる。また、遺伝子導入の効率をあげるために、ポリエチレングリコールやDMSO等を添加することもできる。

【0016】カルボニン遺伝子またはカルボニン遺伝子を含む組換えベクターを膜の中に封入することなく用いる場合には、リン酸カルシウム共沈法(Graham, F.L. et al. Virology 1973 ; 52 : 456)、DEAE-デキストラン法(McCutchan, J. H. et al. J. Natl. Cancer Inst. 1968 ; 41 : 351)等を用いたインビボ(in vivo)トランスフェクションを局部に適用したり、または、カルボニン遺伝子またはカルボニン遺伝子を含む組換えベクターを局所血管内などに適用することにより、カルボニン遺伝子を腫瘍細胞、あるいは、血管平滑筋細胞などの正常細胞内に導入することができる。また、カルボニン遺伝子やカルボニン遺伝子を含む組換えベクターを膜の中に封入して用いる場合には、静脈内への注入により、カルボニン遺伝子を腫瘍細胞あるいは血管内皮などの正常細胞内に導入することができる。

【0017】本発明の抗癌剤の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、一般に、成人では一日当たりカルボニン遺伝子の重量にして、約20mg~600mgの範囲が適当である。本発明の抗癌剤は哺乳類の平滑筋細胞に存在するカルボニンをコードする遺伝子を有効成分とすることから、毒性が低く安全性が高いと考えられる。また、カルボニン遺伝子を平滑筋培養細胞に導入することによって、c-フォス(c-fos)のようなプロトオンコジンの発現を抑制することも知られていることから、本発明の抗癌剤は発癌性の点においても安全性が高いと考えられる。さらに、本発明の抗癌剤はカルボニン遺伝子またはカルボニン遺伝子を含む組換えベクターをリポソーム等の膜の中に封入することにより、細胞毒性がさらに低減される。本発明を、以下の実施例によりさらに詳細に説明する。これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【0018】

##### 【実施例】

A. 癌細胞に直接カルボニン遺伝子を導入した場合の造腫瘍性低減効果の確認試験

【0019】1. ヒトカルボニンcDNAのクローニング  
日本人の肝臓癌患者(男子、54才)のヒト大動脈より、Chirgwin(Chirgwin, J. M. et al. Biochemistry 1977 ; 18 : 5294 - 5299)らの方法に従いRNAを単離し、精

製した。さらにこのRNAからオリゴデックスTM-dT30<Sup>er>; (カタログ番号9021B, 宝酒造社製) を用いてpoly (A)+RNAを精製した。poly (A)+RNA から、ZAP-cDNA 合成キット (カタログ番号200400, ストラタジーン社製) とギガパック<sup>R</sup> Iゴールド (カタログ番号200216, ストラタジーン社製) を用いてヒト大動脈<sup>3</sup> ZAP<sup>R</sup>-cDNAライブラリーを作成した。このライブラリーからの組換え体をナイロンメンブレンフィルターHybond<sup>TM</sup>-N+ (カタログ番号RPN. 137B, アマシャム社製) にプレートし、ニワトリカルボニンcDNA(Takahashi, K. and Nadal-Ginard, B. J. Biol. Chem. 1991 ; 266 : 13284 - 13288)をプローブとして、ブランクハイブリダイゼーションをおこない陽性クローンを得た。陽性クローンをf1ヘルパーファージR408, VCSM13で感染させることによって、pBluescript SK-(Takahashi, K. et al. Japanese Circulation Journal 1992 ; 56 supplement1: 40)にサブクロニングし、そのなかで最長のクローンを選択し、pBluescript SK-hCNとした。これをシークエネース<sup>R</sup> Version 2.0 DNA シークエンシングキット (カタログ番号70781, USB社製) を用いてシークエンスした。得られたヒトカルボニンcDNAの塩基配列は、配列表の配列番号1に示す。

#### 【0020】2. 組換えベクターpcDL-SRα296/hCNの構築

上記1. で調整したpBluescript SK- hCNを制限酵素EcoRI および Kpn I (ベーリンガーマンハイム社製) で消化し、約1300bpのヒトカルボニンcDNA断片を0.8%アガロースゲル電気泳動により分離し、プレッパ-A-ジーンDNA精製キット (カタログ番号732-6010, バイオラッド社製) を用いて精製した。このDNA断片を、同じ制限酵素で処理したプラスミドpcDL-SRα296(Takebe, Y. et al. Molecular and Cellular Biology 1988 ; 8 466 -472) とT4 DNAリガーゼを用いてライゲートした。この反応液を用いてE. coli DH5α株を形質転換し、形質転換株培養液よりプラスミドを精製して、制限酵素EcoRI および Kpn Iで処理したところ、この消化によってヒトカルボニンcDNA約1300bpを含む断片と、pcDL-SRα296プラスミドの断片を生じることから、目的のプラスミドであることが確認された。図1にヒトカルボニンcDNAを含む組換えベクターpcDL-SRα296/hCNの制限酵素地図を示す。組換えベクターpcDL-SRα296/hCNの大きさは約4.7kbである。

表1 トランスフェクションした細胞の造腫瘍性

群	生着率：腫瘍体積(cm <sup>3</sup> )		
	16日	22日	28/29日
対照群	5/5:0.43±0.21	5/5:1.12±0.37	5/5:4.00±1.28
hCN:8-3 移植群	0/5:(-)	1/5: 0.01	2/5:1.45±1.19
hCN:2-1 移植群	1/6:0.08	2/6:0.43±0.37	3/6:2.27±1.11

#### 【0024】5. トランスフェクションした細胞の転移能

#### 【0021】3. B16メラノーマ細胞へのカルボニン遺伝子のトランスフェクション

上記2で得られた組換えベクターを、リポフェクション法により、マウスB16メラノーマ細胞の低転移株B16G6 (Tanaka H. et al. Cancer Research 1988; 48: 1456-1459)に導入した。上記2. で構築した発現ベクターpcDL-SRα296/hCN 30μg とpSV-neo 耐性プラスミド3μgをHepes 緩衝生理食塩水250μlに溶解した。これとは別に、N- [1-(2,3- ジオレオイロキシ)-プロピル] -N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルサルフェート(DOTAP) (ベーリンガーマンハイム社製) (1 mg/ml) 70 μlをHepes緩衝生理食塩水で希釈し250 μlとした。これら両溶液500μlを混合し室温で20分以上インキュベートすることにより、pcDL-SRα296/hCNをリポソーム中に封入した粒子を得た。さらに10%血清を含むDMEM培地14mlを加えて混合した後、B16メラノーマ細胞の培養容器に加え、37℃で18時間培養を行った。10%血清を含むDMEM培地を加え、さらに48時間培養を継続した。継代(1:40)した後、カルボニン遺伝子を組み込んだマウスB16G6メラノーマのサブクローンをグネテシン500μg/mlを培地に加え選択した。

#### 【0022】4. トランスフェクションした細胞の造腫瘍性

上記3でトランスフェクションしたB16G6のいくつかのサブクローンのうちヒトカルボニン遺伝子産物を高発現したサブクローンhCN:8-3とhCN:2-1の1x10<sup>6</sup>個をC57BLマウスの皮下に移植し、経日的(16日後、22日後、28日あるいは29日後)に腫瘍の生着と腫瘍径の大きさを測定した。対照として、トランスフェクトしていないB16G6細胞を移植した。その結果を図3の写真に示す。この結果を数値化し、まとめたものを表1に示す。対照群では16日目までに全例のマウスで腫瘍の生着が認められるのに対し、8-3クローン移植群では全く腫瘍の生着を認めず、2-1クローン移植群では6匹中1匹に腫瘍の生着を認めただけであった。28日あるいは29日後でも8-3クローン移植群は5匹中2匹に、2-1クローン移植群では6匹中3匹に腫瘍の生着を認めただけであった。さらには腫瘍の大きさも対照群に比較してこれら二つのクローン移植群では有意に低下していた。

#### 【0023】

#### 【表1】

#### 試験例1

上記3でトランスフェクションしたB16G6のいくつかの

サブクローンのうちヒトカルボニン遺伝子産物を高発現したサブクローンhCN:8-3とhCN:2-1の $1 \times 10^6$ 個をC57BLマウスの尾静脈内に移植した。対照として、トランスフェクトしていないB16G6を同じ細胞数でC57BLマウスの尾静脈内に移植した。21日間飼育した後、開胸して肺を摘出し、肺表面に形成されたB16G6の結節を計測し、対照群

と比較した。その結果を図4の写真に示す。この結果を数値化し、まとめたものを表2に示す。対照群では転移形成が認められたが、8-3、2-1両クローン移植群では有意な転移結節数の低下を認めた。

【0025】

【表2】

表2 トランスフェクションした細胞の転移能

群	総数	肺転移結節		群数
		平均	標準偏差	
対照群	568	71±20		8
hCN:8-3 移植群	29	3.6±1.1		8
hCN:2-1 移植群	10	1.3±0.5		8

p=0.012

p=0.010

#### 【0026】試験例2

上記3でトランスフェクションしたB16G6のいくつかのサブクローンのうちヒトカルボニン遺伝子産物を高発現したサブクローンhCN:8-3の $1 \times 10^6$ 個をC57BLマウスの尾静脈内に移植した。対照として、ヒトカルボニン遺伝子を含まない発現ベクターpcDL-SRα296をトランスフェクトしたB16G6を同じ細胞数でC57BLマウスの尾静脈内に

移植した。21日間飼育した後、開胸して肺を摘出し、肺表面に形成されたB16G6の結節を計測し、対照群と比較した。その結果を表3に示す。対照群では転移形成が認められたが、8-3クローン移植群では有意な転移結節数の低下を認めた。

【0027】

【表3】

表3 トランスフェクションした細胞の転移能

群	総数	肺転移結節		群数
		平均	標準偏差	
対照群	148	18.5±7.7		8
hCN:8-3 移植群	6	0.7±0.4		8

p<0.001

【0028】B. カルボニン遺伝子を静脈内投与した場合の転移抑制効果の確認試験

#### 1. ヒトカルボニンcDNAのクローニング

上記のビトロ試験Aの1と同様にして、ヒトカルボニンcDNAをクローニングし、pBluescript SK-hCNを得た。

#### 【0029】2. 組換えベクターpCAGGS/hCNの構築

上記1.で調整したpBluescript SK-hCNのヒトカルボニンcDNA 5'側にXho I制限酵素部位を挿入するために、このプラスミドを制限酵素Sam I（ペーリンガー・マンハイム社製）で直線化し、アニーリングしたXho Iリンカー（ペーリンガー・マンハイム社製）とT4 DNAリガーゼ（宝酒造社製）を用いてライゲートした。この遺伝子を導入し発現させるために用いたベクターの構築は下記のようにしておこなった。この反応液を用いてE. coli DH5α株（ライフテクノロジー社より入手）を形質転換し、形質転換株培養液よりプラスミドを精製して、制限酵素Xho Iで処理したところ、Xho I消化によってヒトカルボニンcDNA 1522bpを含む断片と、pBluescript SK-プラスミドの断片を生じることから、目的のプラスミドであることが確認された。

【0030】次に、このプラスミドを制限酵素Xho Iで処理し、0.8%アガロースゲル電気泳動により配列番号1に示されたヒトカルボニンcDNA 1522bpを含む断片を分離

し、プレッパ-A-ジーン DNA精製キット（カタログ番号732-6010、パイオラッド社製）を用いて精製した。このDNA断片を、制限酵素Xho Iで処理したプラスミドpCAGGS(Niwa, H. et al. Gene 1991; 108: 193-200)とT4 DNAリガーゼを用いてライゲートした。この反応液を用いてE. coli DH5α株を形質転換し、形質転換株培養液よりプラスミドを精製して、ヒトカルボニンcDNAの挿入及びプロモーターに対するヒトカルボニンcDNAの方向性を確認するために、制限酵素Xho I及びPst I（ペーリンガー・マンハイム社製）で処理したところ、Xho I消化によってヒトカルボニンcDNA 1522bpを含む断片、及びPst I消化によりヒトカルボニンcDNA 3'側とラビットb-グロビン3'隣接領域を含む約1270bpの断片を生じることから、ヒトカルボニン発現のための組換えベクターであるプラスミドpCAGGS/hCNであることが確認された。プラスミドpCAGGS/hCNを組み込んだ大腸菌DH5αをEscherichia coli DH5α(pCAGGS/hCN)と命名して、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成6年8月31日に寄託した（受託番号: FERM BP-4789）。

【0031】図2にヒトカルボニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCNの制限酵素地図を示す。組換えベクターpCAGGS/hCNの大きさは約6.5kbである。

【0032】3. カルボニン遺伝子による遺伝子治療剤の調製



上記2. で構築した発現ベクターを効率よく個体内に導入するために、発現ベクターのリボソームによる被覆をおこなったが、その調製方法は下記のとおりであった。

【0033】上記2. で構築した発現ベクターpCAGGS/hCN 100  $\mu$ gをHepes緩衝生理食塩水100  $\mu$ lに溶解した。この溶液とN- [1-(2,3- ジオレオイロキシ)-プロピル] -N,N,N- トリメチルアンモニウムメチルサルフェート (DOTAP) (ペーリンガー・マンハイム社製) (1mg/ml) 200  $\mu$ lを混合し室温で20分以上インキュベーションすることにより、pCAGGS/hCNをリボソーム中に封入した粒子を得た。また、対照実験のために、上記2. で構築した組換えベクターpCAGGS/hCNの代わりにプラスミドpCAGGSを用いて、上記の操作を繰り返すことにより、プラスミドpCAGGSをリボソーム中に封入した粒子を得た。

【0034】4. カルボニン遺伝子による癌転移抑制効果

#### 試験例1

マウスの腫瘍であるB16メラノーマより選択されたB16高転移株B16G10 (Tanaka et al. Cancer Res 48 1456-1459, 1998)を使用した。癌転移抑制作用の評価はFidlerらの方法に従って行った (Poste, G and Fidler, I.

表4 カルボニン遺伝子による癌転移抑制効果

薬剤	総数	肺転移結節	
		平均	群数
DOTAP	1237	412 $\pm$ 57	3
pCAGGS/hCN	453	113 $\pm$ 23	4
pCAGGS/hCN+DOTAP	6	2.7 $\pm$ 0.3	3

#### 【0036】試験例2

C57BLマウス (8~12週令、メス) に組換えベクターpCAGGS/hCN をリボソーム中に封入した粒子を300  $\mu$ l尾静脈より投与した。対照として、リボソーム化試薬であるN- [1-(2,3- ジオレオイロキシ)-プロピル] -N,N,N- トリメチルアンモニウムメチルサルフェート (DOTAP) を同量投与した。一週間飼育を行った後、フラスコ内で増殖させたB16G10 をトリプシン・EDTA溶液で培養容器よりはがし、この細胞をPBS溶液で生細胞として1mlあたり1x10<sup>6</sup>個となるように懸濁した。この細胞液の0.1mlをマウス尾静脈より移植し、さらに21日間飼育した後、開胸して肺を摘出し、肺表面に形成されたB16G10の結節を計測し、対照群と比較した。その結果を表5に示す。組換えベクターpCAGGS/hCN をリボソーム中に封入した粒子を投与した群では著明な転移結節数の減少が認められ、ヒトカルボニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCN は肺への癌転移を抑制していることが確認できた。

#### 【0037】

#### 【表5】

J., Nature 1980; 283; 1329-145)。C57BLマウス (8~12週令、メス) に組換えベクターpCAGGS/hCN をリボソーム中に封入した粒子、または、組換えベクターpCAGGS/hCN のみを300  $\mu$ l尾静脈より投与した。対照として、リボソーム化試薬であるN- [1-(2,3- ジオレオイロキシ)-プロピル] -N,N,N- トリメチルアンモニウムメチルサルフェート (DOTAP) を投与した。一週間飼育を行った後、フラスコ内で増殖させたB16G10 をトリプシン・EDTA溶液で培養容器よりはがし、この細胞をPBS溶液で生細胞として1mlあたり1x10<sup>6</sup>個となるように懸濁した。この細胞液の0.1mlをマウス尾静脈より移植し、さらに21日間飼育した後、開胸して肺を摘出し、肺表面に形成されたB16G10の結節を計測し、対照群と比較した。その結果を図5および表4に示す。組換えベクターpCAGGS/hCN をリボソーム中に封入した粒子を投与した群では著明な転移結節数の減少が認められ、ヒトカルボニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCN は肺への癌転移を抑制していることが確認できた。

#### 【0035】

#### 【表4】

表5 カルボニン遺伝子による癌転移抑制効果

薬剤	肺転移結節		
	総数	平均	群数
DOTAP	>1000	>500	2
pCAGGS/hCN+DOTAP	32	16	2

#### 【0038】試験例3

マウスの肝細胞癌であるG5F5を用いてヒトカルボニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCN の転移抑制効果を検討した。癌転移抑制作用の評価はFidlerらの方法に従って行った。C57BLマウス (8~12週令、メス) に組換えベクターpCAGGS/hCN をリボソーム中に封入した粒子、または、組換えベクターpCAGGS/hCN のみを300  $\mu$ l尾静脈より投与した。対照として、リボソーム化試薬であるN- [1-(2,3- ジオレオイロキシ)-プロピル] -N,N,N- トリメチルアンモニウムメチルサルフェート (DOTAP) を同量投与した。三日間飼育を行った後、フラスコ内で増殖させたG5F5をトリプシン・EDTA溶液で培養容器よりはがし、この細胞をPBS溶液で生細胞として1mlあたり2x10<sup>7</sup>個となるように懸濁した。この細胞液の0.1mlをマウス尾静脈より移植した。腫瘍細胞移植一週間後、二週間後にさらに、組換えベクターpCAGGS/hCN をリボソーム中



に封入した粒子、または、組換えベクターpCAGGS/hCNのみを300 $\mu$ l尾静脈より投与した。対照として、リポソーム化試薬であるN- [1-(2,3- ジオレオイロキシ)-プロピル] -N,N,N- トリメチルアンモニウムメチルサルフェート(DOTAP)を同量投与した。さらに一週間飼育した後、開胸して肺を摘出し、肺表面に形成されたG5F5の結節を計測し、対照群と比較した。組換えベクターpCAGGS/hCN をリポソーム中に封入した粒子を投与した群では著明な転移結節数の減少が認められ、ヒトカルボニンcDNAを含む組換えベクターpCAGGS/hCN は肺への癌転移を抑制していることが確認できた。

#### 【0039】

【発明の効果】本発明の抗癌剤により、癌細胞の造腫瘍

性を低下させ、転移能を減弱させることができる。従って、本発明の抗癌剤は、癌の治療および予防、特に癌転移の抑制に極めて有効である。

#### 【0040】

##### 【配列表】

【0041】配列番号：1

配列の長さ：1522

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ヒト

##### 配列

AACATGTGAG GAGGGAAGAG TGTGCAGACG GAACTTCAGC CGCTGCCTCT GTTCTCAGCG	60
TCAGTGCCGC CACTGCCCCC GCCAGAGCCC ACCGGCCAGC ATG TCC TCT GCT CAC	115
Met Ser Ser Ala His	5
TTC AAC CGA GGC CCT GCC TAC GGG CTG TCA GCC GAG GTT AAG AAC AAG	163
Phe Asn Arg Gly Pro Ala Tyr Gly Luu Ser Ala Glu Val Lys Asn Lys	
10 15 20	
CTG GCC CAG AAG TAT GAC CAC CAG CGG GAG CAG GAG CTG AGA GAG TGG	211
Leu Ala Gln Lys Tyr Asp His Gln Arg Glu Gln Glu Leu Arg Glu Trp	
25 30 35	
ATC GAG GGG GTG ACA GGC CGT CGC ATC GGC AAC AAC TTC ATG GAC GGC	259
Ile Glu Gly Val Thr Gly Arg Arg Ile Gly Asn Asn Phe Met Asp Gly	
40 45 50	
CTC AAA GAT GGC ATC ATT CTT TGC GAA TTC ATC AAT AAG CTG CAG CCA	307
Leu Lys Asp Gly Ile Ile Leu Cys Glu Phe Ile Asn Lys Leu Gln Pro	
55 60 65	
GGC TCC GTG AAG AAG ATC AAT GAG TCA ACC CAA AAT TGG CAC CAG CTG	355
Gly Ser Val Lys Lys Ile Asn Glu Ser Thr Gln Asn Trp His Gln Leu	
70 75 80 85	
GAG AAC ATC GGC AAC TTC ATC AAG GCC ATC ACC AAG TAT GGG GTG AAG	403
Glu Asn Ile Gly Asn Phe Ile Lys Ala Ile Thr Lys Tyr Gly Val Lys	
90 95 100	
CCC CAC GAC ATT TTT GAG GCC AAC GAC CTG TTT GAG AAC ACC AAC CAT	451
Pro His Asp Ile Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe Glu Asn Thr asn His	
105 110 115	
ACA CAG GTG CAG TCC ACC CTC CTG GCT TTG GCC AGC ATG GCG AAG ACG	499
Thr Gln Val Gln Ser Thr Leu Leu Ala Leu Ala Ser Met Ala Lys Thr	
120 125 130	
AAA GGA AAC AAG GTG AAC GTG GGA GTG AAG TAC GCA GAG AAG CAG GAG	547
Lys Gly Asn Lys Val Asn Val Gly Val Lys Tyr Ala Glu Lys Gln Glu	
135 140 145	
CGG AAA TTC GAG CCG GGG AAG CTA AGA GAA GGG CGG AAC ATC ATT GGG	595
Arg Lys Phe Glu Pro Gly Lys Leu Arg Glu Gly Arg Asn Ile Ile Gly	
150 155 160 165	
CTG CAG ATG GGC ACC AAC AAG TTT GCC AGC CAG CAG GGC ATG ACG GCC	643
Leu Gln Met Gly Thr Asn Lys Phe Ala Ser Gln Gln Gly Met Thr Ala	

170	175	180	
TAT GGC ACC CGG CGC CAC CTC TAC GAC CCC AAG CTG GGC ACA GAC CAG	691		
Tyr Gly Thr Arg Arg His Leu Tyr Asp Pro Lys Leu Gly Thr Asp Gln			
185	190	195	
CCT CTG GAC CAG GCG ACC ATC AGC CTG CAG ATG GGC ACC AAC AAA GGA	739		
Pro Leu Asp Gln Ala Thr Ile Ser Leu Gln Met Gly Thr Asn Lys Gly			
200	205	210	
GCC AGC CAG GCT GGC ATG ACT GCG CCA GGG ACC AAG CGG CAG ATC TTC	787		
Ala Ser Gln Ala Gly Met Thr Ala Pro Gly Thr Lys Arg Gln Ile Phe			
215	220	225	
GAG CCG GGG CTG GGC ATG GAG CAC TGC GAC ACG CTC AAT GTC AGC CTG	835		
Glu Pro Gly Leu Gly Met Glu His Cys Asp Thr Leu Asn Val Ser Leu			
230	235	240	245
CAG ATG GGC AGC AAC AAG GGC GCC TCG CAG CCG GGC ATG ACG GTG TAT	883		
Gln Met Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ser Gln Arg Gly Met Thr Val Tyr			
250	255	260	
GGG CTG CCA CGC CAG GTC TAC GAC CCC AAG TAC TGT CTG ACT CCC GAG	931		
Gly Leu Pro Arg Gln Val Tyr Asp Pro Lys Tyr Cys Leu Thr Pro Glu			
265	270	275	
TAC CCA GAG CTG GGT GAG CCC GCC CAC AAC CAC CAC GCA CAC AAC TAC	979		
Tyr Pro Glu Leu Gly Glu Pro Ala His Asp His His Ala His Asn Tyr			
280	285	290	
TAC AAT TCC GCC TAGGGCCACA AGGCCTTCCC TGTTTTCCCC CCAAGGGAGG	1031		
Tyr Asn Ser Ala			
295			
CTGCTGCTGC TCTTGGCTGG ACCCAGCCAG GCCCAGCCGA CCCCTCTCC CTGCATGGCA	1091		
TCCTCCAGCC CCTGTAGAAC TCAACCTCTA CAGGGTTAGA GTTTGGAGAG AGCAGACTGG	1151		
CGGGGGGGCC ATTGGGGGGA AGGGGACCCT CCGCTCTGTA GTGCTACAGG GTCCAACATA	1211		
GAGCCGGGTG TCCCAACAG CGCCCAAGG ACGCACTGAG CAACGCTATT CCAGCTGTCC	1271		
CCCCACTCCC TCACAAGTGG GTACCCCCAG GACCAGAAGC TCCCCCAGCA AAGCCCCCAG	1331		
AGCCCAAGGCT CGGCCTGCC CCACCCATT CCGCAGTGG GAGCAAAGTG CATGCCCAGA	1391		
GACCCAGCGG ACACACGCGG TTTGGTTTGC AGCGACTGGC ATACTATGTG GATGTGACAG	1451		
TGGCGTTTGT AATGAGAGCA CTTTCTTTTT TTCTATTTC ACTGGAGCAC AATAAATGGC	1511		
TGTAATCT C	1522		

【0042】配列番号：2

配列の長さ：297

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

Met Ser Ser Ala His Phe Asn Arg Gly Pro Ala Tyr Gly Leu Ser	
5 10 15	
Ala Glu Val Lys Asn Lys Leu Ala Gln Lys Tyr Asp His Gln Arg	
20 25 30	
Glu Gln Glu Leu Arg Glu Trp Ile Glu Gly Val Thr Gly Arg Arg	
35 40 45	
Ile Gly Asn Asn Phe Met Asp Gly Leu Lys Asp Gly Ile Ile Leu	
50 55 60	
Cys Glu Phe Ile Asn Lys Leu Gln Pro Gly Ser Val Lys Lys Ile	
65 70 75	
Asn Glu Ser Thr Gln Asn Trp His Gln Leu Glu Asn Ile Gly Asn	
80 85 90	
Phe Ile Lys Ala Ile Thr Lys Tyr Gly Val Lys Pro His Asp Ile	

	95	100	105
Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe Glu Asn Thr	asn His Thr Gln Val		
	110	115	120
Gln Ser Thr Leu Leu Ala Leu Ala Ser Met Ala Lys Thr Lys Gly			
	125	130	135
Asn Lys Val Asn Val Gly Val Lys Tyr Ala Glu Lys Gln Glu Arg			
	140	145	150
Lys Phe Glu Pro Gly Lys Leu Arg Glu Gly Arg Asn Ile Ile Gly			
	155	160	165
Leu Gln Met Gly Thr Asn Lys Phe Ala Ser Gln Gln Gly Met Thr			
	170	175	180
Ala Tyr Gly Thr Arg Arg His Leu Tyr Asp Pro Lys Leu Gly Thr			
	185	190	195
Asp Gln Pro Leu Asp Gln Ala Thr Ile Ser Leu Gln Met Gly Thr			
	200	205	210
Asn Lys Gly Ala Ser Gln Ala Gly Met Thr Ala Pro Gly Thr Lys			
	215	220	225
Arg Gln Ile Phe Glu Pro Gly Leu Gly Met Glu His Cys Asp Thr			
	230	235	240
Leu Asn Val Ser Leu Gln Met Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ser Gln			
	245	250	255
Arg Gly Met Thr Val Tyr Gly Leu Pro Arg Gln Val Tyr Asp Pro			
	260	265	270
Lys Tyr Cys Leu Thr Pro Glu Tyr Pro Glu Leu Gly Glu Pro Ala			
	275	280	285
His Asp His His Ala His Asn Tyr Tyr Asn Ser Ala			
	290	295	

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ヒトカルボニンcDNAを組み込んだ発現ベクターであるpcDL-SR $\alpha$ 296/hCNのプラスミドの構造を示す図である。

【図2】図2は、ヒトカルボニンcDNAを組み込んだ発現ベクターであるpCAGGS/hCNのプラスミドの構造を示す図である。

【図3】図3は、ヒトカルボニン遺伝子を導入すること

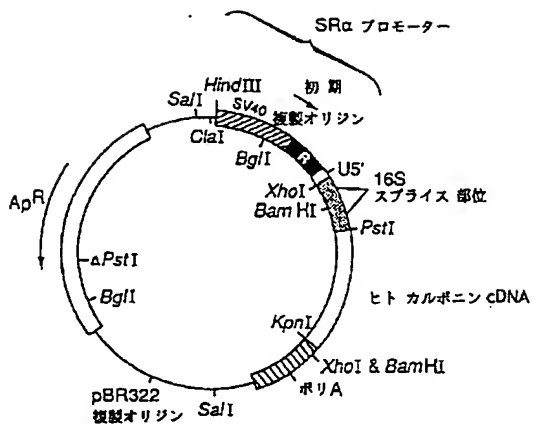
により形質転換したB16メラノーマ細胞の造腫瘍性を示す生物の形態の写真である。

【図4】図4は、ヒトカルボニン遺伝子を導入することにより形質転換したB16メラノーマ細胞の転移能を示す生物の形態の写真である。

【図5】図5は、B16メラノーマ細胞の実験的転移に対するヒトカルボニン遺伝子による遺伝子治療の結果を示す生物の形態の写真である。

【図 1】

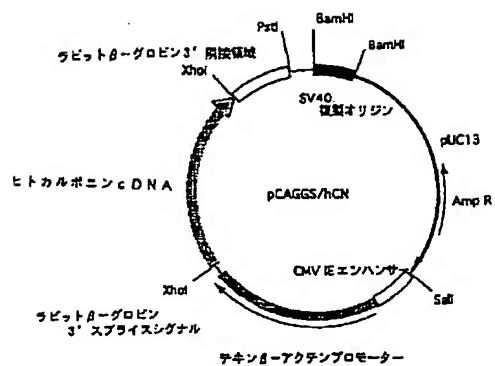
図 1



pcDL-SRα 296/hCN

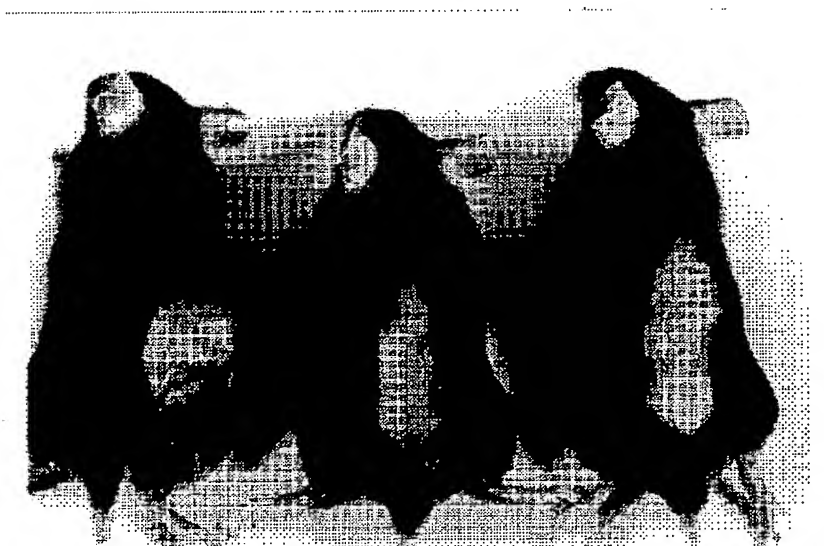
【図 2】

図 2



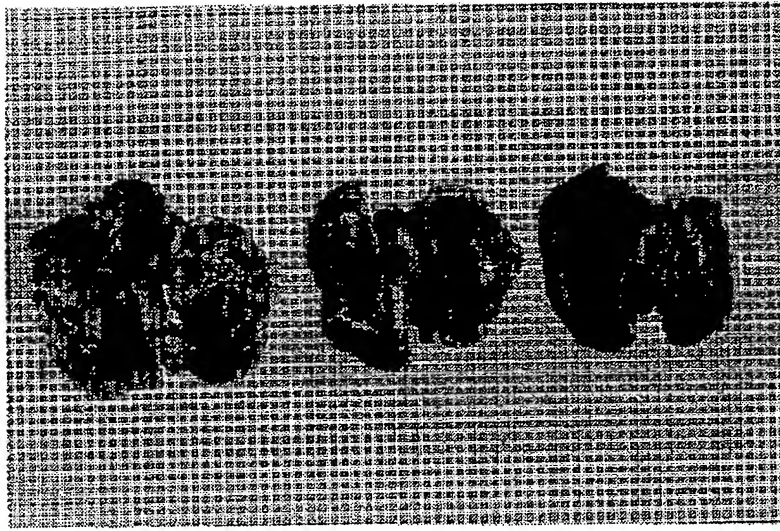
【図 3】

図面代用写真



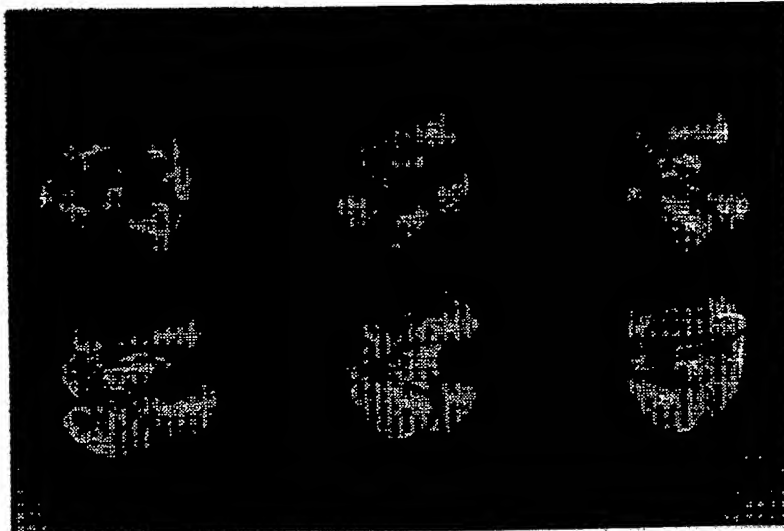
【图4】

图4代用写真



【图5】

图5代用写真



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

// C 1 2 N 15/09

識別記号

Z N A

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

**ANTICANCER AGENT**

Patent Number: JP8073380  
Publication date: 1996-03-19  
Inventor(s): TAKAHASHI KATSUTO;; SHIBATA NOBUHIKO  
Applicant(s): OSAKA PREFECTURE;; KIRIN BREWERY CO LTD  
Requested Patent: ☐ JP8073380  
Application Number: JP19940232498 19940902  
Priority Number(s):  
IPC Classification: A61K48/00; A61K9/127; A61K31/70; C07H21/04  
EC Classification:  
Equivalents:

---

**Abstract**

---

**PURPOSE:** To obtain an anticancer agent, containing a calponin gene as an active ingredient and effective in treating and preventing cancer especially suppression of cancer metastatic ability due to its ability to reduce both the tumorigenicity and the metastasis of a cancerous cell.

**CONSTITUTION:** This anticancer agent contains a calponin gene (preferably a human-derived calponin gene containing a base sequence of the formula) as an active ingredient. the calponin gene is preferably sealed in a content of 10-50wt.% in a liposome using N-[1-(2,3-dioleyloxy)-propyl]-N,N,N- trimethylammonium methyl sulfate as a raw material for use from the viewpoint of cytotoxicity. The daily does of the anticancer agent for an adult is preferably 20-600mg expressed in terms of the weight of the calponin. A recombinant vector containing the calponin gene may be used as the calponin gene.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2